

10/529472  
PCT/DE02/04148  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**



REC'D 12 FEB 2003

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Aktenzeichen:**

101 55 055.3

**Anmeldetag:**

09. November 2001

**Anmelder/Inhaber:**

FRIZ Biochem GmbH, München/DE

**Bezeichnung:**

Fluoreszenz-Quenchen zur Detektion von  
Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungser-  
eignissen bei hohen Salz-Konzentrationen

**IPC:**

C 12 Q 1/68

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. Januar 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust

**BEST AVAILABLE COPY**

# Fluoreszenz-Quenchen zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen bei hohen Salz-Konzentrationen



5

## Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen.

10

## Stand der Technik

15 In der Krankheitsdiagnose, bei toxikologischen Testverfahren, in der genetischen Forschung und Entwicklung, sowie auf dem Agrar- und pharmazeutischen Sektor werden Immunoassays und zunehmend auch die Sequenzanalyse von DNA und RNA eingesetzt. Neben den bekannten seriellen Verfahren mit autoradiographischer oder optischer Detektion finden zunehmend parallele Detektionsverfahren mittels Array-  
20 Technologie, sogenannten DNA- oder Protein-Chips, Verwendung. Auch bei diesen parallelen Verfahren beruht die Detektion auf optischen, radiographischen, massenspektrometrischen oder elektrochemischen Methoden.

25 Zur Genanalyse auf einem Chip wird auf einer Oberfläche eine Bibliothek bekannter DNA-Sequenzen ("Sonden-Oligonukleotide") in einem geordneten Raster fixiert, so dass die Position jeder individuellen DNA-Sequenz bekannt ist. In der Untersuchungslösung anwesende Fragmente aktiver Gene ("Target-Oligonukleotide"), deren Sequenzen zu bestimmten Sonden-Oligonukleotiden auf dem Chip komplementär sind, können durch Nachweis der entsprechenden  
30 Hybridisierungsereignisse auf dem Chip identifiziert werden. Im Allgemeinen erfolgt die Analyse über optische (oder autoradiographische) Detektionsverfahren unter Verwendung von Target-Oligonukleotiden, die mit einem Radiolabel (z. B.  $^{32}\text{P}$ ) oder einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. Fluorescein, Cy3 oder Cy5) markiert sind. Die Verwendung von Fluoreszenzlabel und entsprechenden Fluoreszenz-Scannern

überwiegt dabei zunehmend die Anwendung von Radiolabel. Die zur Zeit auf dem Markt erhältlichen Fluoreszenz-Scanner ermöglichen den Nachweis von Fluorophoren im Subattomol-Bereich.

- 5 Die Verwendung von markierten Targets zum Nachweis von Hybridisierungsereignissen beinhaltet jedoch einige Nachteile. Zum einen muss die Markierung vor der eigentlichen Messung erfolgen, was einen zusätzlichen Syntheseschritt und damit zusätzlichen Arbeitsaufwand bedeutet. Zudem ist es schwierig, eine homogene Markierung des Probenmaterials zu gewährleisten. Außerdem sind stringente Waschbedingungen
- 10 notwendig, um im Anschluss an eine Hybridisierung nicht oder unspezifisch gebundenes Material zu entfernen.

- Sowohl für die Protein- als auch für die DNA-Analyse ist es daher wünschenswert und für den Anwender vorteilhaft, wenn die Targets (Antikörper bzw. Antigen oder DNA-
- 15 Fragment) nicht mit einem Detektionslabel modifiziert werden müssten und nach der Hybridisierung keine komplizierten Waschschrte notwendig wären.

- Die Nachteile der Markierung des Probenmaterials mit radioaktiven Elementen oder Fluoreszenzfarbstoffen können umgangen werden, wenn an Stelle der Targets die
- 20 Sondenmoleküle mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Nach diesem Prinzip funktionieren die sogenannten molekularen Leuchten (molecular beacons). Diese einsträngigen Oligonukleotide weisen eine Haarnadelstruktur (hairpin, stem-and-loop) auf und tragen am einen Ende der Sequenz einen Fluorophor (z. B. fluorescein, TexasRed®) und am anderen Ende der Sequenz einen geeigneten
- 25 Fluoreszenzlöcher (z. B. DABCYL). Durch die spezielle geometrische Anordnung befinden sich die fluoreszierende Gruppe und die Einheit, die zur Löschung der Fluoreszenz führt, in räumlicher Nähe zueinander. Daher zeigen die Sonden nur eine äußerst geringe Fluoreszenz. In Gegenwart der entsprechenden zur Sequenz der Schlinge (loop) komplementären Sequenz (Target) erfolgt die Hybridisierung in diesem
- 30 Bereich. Dies führt zu einer Änderung der Konformation und zur Trennung von Fluorophor und Quencher, was als starke Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden kann.

Neben organischen Molekülen (wie DABCYL) werden auch Gold-Nanopartikel als effiziente Quencher eingesetzt (vgl. Nature Biotech. Vol. 19, 2001, Seite 365). Das Quenchen der Fluoreszenz durch Metalle beruht primär auf einem strahlungslosen Energietransfer vom Farbstoffmolekül zum Metall. Durch die Verwendung von Gold-Nanopartikeln wird eine größere Sensitivität beobachtet als bei organischen Quenchern. Außerdem werden Farbstoffe bis in den nahen Infrarot-Bereich effizient gequencht. Ein Nachteil dieser Methode liegt allerdings darin, dass Gold-Nanopartikel bei Temperaturen über 50°C nicht mehr stabil sind. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass diese Methode auf die Untersuchung von Lösungen beschränkt ist und daher nur wenige Sequenzen zur gleichen Zeit untersucht werden können, der Parallelisierungsgrad dieses Ansatzes also gering ist.

Aus dem Stand der Technik sind auch Untersuchungen zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen bekannt (T. Neumann, Dissertation "Strategies for Detecting DNA Hybridisation Using Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy", Mainz, Juni 2001). Aus dieser Arbeit geht hervor, dass die Salz-Konzentration in der die Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung einen Einfluss auf die Konformation der Nukleinsäure-Oligomere ausübt. Es wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung um einen Faktor 1,75 festgestellt, was zu einer unbefriedigenden Nachweisgrenze, insbesondere bei parallelen Verfahren, führt.

Obwohl es also viele Detektionsmöglichkeiten für Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignisse gibt, ist der Bedarf an einfachen, kostengünstigen, problemlos durchzuführenden und verlässlichen Detektionsprinzipien vor allem im Bereich der weniger dichten Array-Technologien (DNA- und Protein-Chips mit wenigen einzelnen bzw. bis zu mehreren hunderttausend Test-sites pro  $\text{cm}^2$  z. B. für sogenannte POC (Point of Care)- Systeme bzw. für high throughput screening - HTS - Systeme) hoch.

## Darstellung der Erfindung

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden bereit zu stellen, welches die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren gemäß unabhängigem Patentanspruch 1 und durch den Kit gemäß unabhängigem Anspruch 15 gelöst.

10 Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den Beispielen.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

### Genetik

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PNA	Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2\text{-Base})-CH_2CO\text{-}$ Einheit hybridisiert PNA mit DNA.)
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
Base	A, G, T, C oder U
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder

wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z. B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit zur sequenzspezifischen Bindung natürlich vorkommender cDNA oder RNA.

Nukleotid

Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z. B. Nukleinsäure-Oktamer: Eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).

Nukleinsäure-Oligomer

Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.

Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z. B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.

Abkürzung für Oligonukleotid.

Zur Ausbildung der Watson Crick Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.

single strand (Einzelstrang)

nt

Nukleinsäure-  
Oligomer

ns-Oligomer

Oligomer

Oligonukleotid

Oligo

Mismatch

ss

ds

double strand (Doppelstrang)

**Substanzen**

Fluorophor

chemische Verbindung (chemische Substanz), die in der Lage ist, bei Anregung mit Licht ein längerwelliges (rotverschobenes) Fluoreszenzlicht abzugeben. Fluorophore (Fluoreszenzfarbstoffe) können Licht in einem Wellenlängenbereich vom ultravioletten (UV) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum infraroten (IR) Bereich absorbieren. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind um 15 bis 40 nm verschoben (Stokes-Shift).

FP

Fluorophor

Cy3™

5,5'-disulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin

(Fluoreszenzfarbstoff der Firma Amersham Life Science, Inc.)

Cy5™

5,5',7,7'-tetrasulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-benzindodicarbocyanin

(Fluoreszenzfarbstoff der Firma Amersham Life Science, Inc.)

Fluorescein

Resorcinphtalein (Fluoreszenzfarbstoff)

Rhodamin 6G

Basic Red 1 (Fluoreszenzfarbstoff)

Texas Red®

Fluoreszenzfarbstoff der Firma Molecular Probes, Inc.

DABCYL

4-((4'-(Dimethylamino)phenyl)azo)benzoesäure

Fluoreszenzlöschung

strahlungsloser Energietransfer

Fluoreszenz-

Fluoreszenzlöschung

Quenchen

Quench-Oberfläche

leitende (Metall)-Oberfläche, die durch einen Energietransfer Fluoreszenz löschen können (insbesondere Gold-, Silber-, Kupfer-Oberflächen usw.)

EDTA

Ethylendiamin-Tetraacetat (Natriumsalz)

Ligand

Bezeichnung für Moleküle, die von Ligaten spezifisch

gebunden werden; Beispiele von Liganden sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Ligand eines Antigens), Antigene (als Ligand eines Antikörpers), Rezeptoren (als Ligand eines Hormons), Hormone (als Ligand eines Rezeptors) oder Nukleinsäure-Oligomere (als Ligand des komplementären Nukleinsäure-Oligomers).

Ligat.

Bezeichnung für (Makro-) Molekül, an dem sich spezifische Erkennungs- und Bindungsstellen für die Ausbildung eines Komplexes mit einem Liganden befinden (Template).

Linker

molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Hetero-Alkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit dem entsprechenden Reaktionspartner eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d. h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Bevorzugte Linker sind solche der Kettenlänge 1 - 20, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, einem Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.

Spacer

Linker, der über die reaktiven Gruppen an eine oder beide der zu verbindenden Strukturen (siehe Linker) kovalent angebunden ist. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge



1 - 20, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.

### Modifizierte Oberflächen/Elektroden

*Au-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-ss-oligo-FP*

Gold-Oberfläche mit kovalent aufgebrachtem Monolayer aus derivatisiertem Einzelstrang-Oligonukleotid. Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S)<sub>2</sub> zum P-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Am freien Ende trägt das Sonden-Oligonukleotid einen kovalent angebundenen Fluorophor (FP) wie z. B. Cy3™, Cy5™, Texas Red®, Rhodamin 6G, Fluorescein etc.

*Au-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-ds-oligo-FP*

*Au-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-ss-oligo-FP* hybridisiert mit dem zu ss-oligo komplementären Oligonukleotid.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen, das als ersten Schritt das Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche umfasst. Die Modifikation der Oberfläche besteht dabei in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren, wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind. Die weiteren Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren, Einstellen einer definierten Salzkonzentration von größer 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors, Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche, zweite Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors und Vergleich der in den beiden Detektionen bestimmten Fluoreszenzintensitäten.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem einen Kit, der eine modifizierte Oberfläche umfasst, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist ein Vergleich der detektierten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten erforderlich. Diese Referenzwerte können aus vorangegangenen Messungen bereits vorliegen und brauchen daher im  
5. allgemeinsten Fall nicht im Laufe des erfindungsgemäßen Verfahrens detektiert werden. Da die Referenzwerte aber im Idealfall unter exakt den gleichen äußeren Bedingungen bestimmt werden sollen wie die eigentlichen Messwerte der Fluoreszenzintensitäten, wird gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes und Einstellen  
10. einer definierten Stärke des elektrischen Feldes am Ort der modifizierten Ligaten und vor dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche eine erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors durchgeführt. Die so erhaltenen Werte werden dann als Referenzwerte verwendet.

15. Alternativ können die Referenzwerte auch gleichzeitig mit den Messwerten der Fluoreszenzintensität bestimmt werden, also nach dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche. Dies kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Entweder ist ein Bereich der modifizierten Oberfläche bekannt, der im wesentlichen keine Liganden trägt, oder es ist ein Bereich der modifizierten Oberfläche bekannt, der  
20. im wesentlichen ausschließlich Ligand/Ligat-Assoziat trägt. Es muss also im ersten Fall sichergestellt sein, dass in der Probe keinerlei Liganden anwesend sind, die mit den in dem besagten Bereich der modifizierten Oberfläche anwesenden Ligaten Ligat/Ligand-Assoziat ausbilden können. Im zweiten Fall muss umgekehrt sichergestellt sein, dass in der Probe eine ausreichende Menge an Liganden vorhanden  
25. sind, die mit im wesentlichen der ganzen Menge an in dem definierten Bereich anwesenden Ligaten Ligand/Ligat-Assoziat ausbilden. Die auf diese beiden Arten bestimmten Referenzwerte spiegeln die Fluoreszenzintensität bei 0% Assoziatbildung bzw. bei 100% Assoziatbildung wieder und können zur quantitativen Bestimmung der Assoziatbildung in den anderen Bereichen der modifizierten Oberfläche dienen.

30

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die beiden beschriebenen Referenzmessungen durchgeführt. Es wird also nach dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche sowohl die Fluoreszenzintensität in einem Bereich der modifizierten Oberfläche bestimmt, der im

wesentlichen keine Liganden trägt, als auch in einem Bereich der modifizierten Oberfläche, der im wesentlichen ausschließlich Ligand/Ligat-Assoziat trägt. Durch die Bestimmung der beiden Extremwerte ist eine quantitative Detektion mit höherer Genauigkeit erforderlich. Es versteht sich, dass in diesem Fall sich die Ligaten des ersten Bereiches von den Ligaten des zweiten Bereiches unterscheiden müssen.

Erfindungsgemäß wird die Detektion der Fluoreszenz nach Einstellen einer definierten Salzkonzentration von größer 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung durchgeführt. Bevorzugte Salzkonzentrationen liegen in den Bereichen zwischen 0,5 und 10 mol/l, zwischen 1 und 10 mol/l, zwischen 0,5 und 3 mol/l und insbesondere zwischen 2 und 3 mol/l, weil in diesen Bereichen gefunden wurde, dass eine besonders große Differenz in der Fluoreszenzintensität zwischen dem hybridisierten und dem nicht-hybridisierten Nukleinsäure-Oligomer besteht. Dadurch wird eine besonders sichere Detektion der Hybridisierungsergebnisse ermöglicht.

### Die Quench-Oberfläche

Mit dem Begriff "Oberfläche" wird jedes Trägermaterial bezeichnet, das geeignet ist, direkt oder nach entsprechender chemischer Modifizierung Fluorophor-derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere zu tragen, die kovalent an der Oberfläche immobilisiert sind und deren Fluoreszenz nahe an der Oberfläche (in ca. 1 bis 50 Angstrom Abstand zur Oberfläche) durch Fluoreszenzlöschung (strahlungsloser Energietransfer zwischen dem Fluorophor als Emitter und der Oberfläche als Absorber) signifikant ( $> 10\%$  der erwarteten Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abwesenheit der Oberfläche bei ansonsten gleichen Bedingungen) reduziert wird. Insbesondere sind Gold und Silber als Quench-Oberflächenmaterial geeignet. Die Bezeichnung Oberfläche ist unabhängig von den räumlichen Dimensionen der Oberfläche und beinhaltet auch Nanopartikel (Partikel oder Cluster aus wenigen einzelnen bis mehreren hunderttausend Oberflächen-Atomen oder -Molekülen). Die Oberfläche kann zusätzlich an einen festen Träger wie z.B. Glas, Metall oder Plastik gebunden vorliegen.

## Bindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche

Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäure-Oligomeren an einer Oberfläche sind dem Fachmann bekannt. Die Immobilisierung kann z. B. kovalent über Amino-, Hydroxyl-, Epoxid- oder Carboxygruppen des Trägermaterials mit natürlicherweise am Nukleinsäure-Oligomer vorhandenen oder durch Derivatisierung am Nukleinsäure-Oligomer angebrachten Thiol-, Hydroxy-, Amino- oder Carboxylgruppen erfolgen. Das Nukleinsäure-Oligomer kann direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer Oberfläche verbunden werden. Daneben kann das Nukleinsäure-Oligomer durch die bei Immunoassays üblichen Methoden verankert werden wie z. B. durch Verwendung von biotinylierten Nukleinsäure-Oligomeren zur nicht-kovalenten Immobilisierung an Avidin oder Streptavidin-modifizierten Oberflächen. Die chemische Modifikation der Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren mit einer Oberflächen-Ankergruppe kann bereits im Verlauf der automatisierten Festphasensynthese oder aber in gesonderten Reaktionsschritten eingeführt werden. Dabei wird auch das Nukleinsäure-Oligomer direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer Oberfläche der oben beschriebenen Art verknüpft. Diese Bindung kann auf verschiedene, aus dem Stand der Technik bekannten Arten durchgeführt werden (vgl. z. B. Hartwich, G.: ELEKTROCHEMISCHE DETEKTION VON SEQUENZSPEZIFISCHEN NUKLEINSÄUREOLIGOMER-HYBRIDISIERUNGSEREIGNISSEN (1999), WO 00/42217).

Bei der Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberflächen ist auf einen besonders wichtigen Punkt zu achten. Grundsätzlich herrschen zur Detektion der Differenz der Fluoreszenzintensität von hybridisierten Nukleinsäure-Oligomeren und einsträngigen Nukleinsäure-Oligomeren dann besonders günstige Bedingungen, wenn der Fluorophor sich in nur einem der Zustände "hybridisiert" oder "nicht hybridisiert" möglichst nahe an der modifizierten Oberfläche befindet. Das Ausmaß des Quench-Vorgangs verändert sich ja bekanntermaßen mit der sechsten Potenz des Abstandes zwischen Quench-Oberfläche und Fluorophor. Solche besonders günstigen Bedingungen können nur mit speziellen Anbindungstechniken erreicht werden. Es muss bei der Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere darauf geachtet werden, dass diese entweder völlig ohne weiteres Co-Adsorbat an die Oberfläche gebunden werden oder, falls ein Co-Adsorbat notwendig erscheint, dass dieses eine möglichst dünne Schicht

über der Oberfläche ausbildet. Es muss also entweder eine direkte Anbindung des Nukleinsäure-Oligomers an die Oberfläche erfolgen oder eine Belegung zusammen mit möglichst kurzkettigen Co-Adsorbaten wie z. B. kurzkettigen Thiolen. Bevorzugt werden Co-Adsorbate der Kettenlänge 1 bis 10, insbesondere der Kettenlänge 1 bis 5.

5

Insbesondere nachteilig ist in diesem Zusammenhang eine Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere in Form einer Verbindung Oberfläche-Biotin-Avidin-Biotin-Oligomer. Bei einer solchen Anbindung ist der Fluorophor immer durch eine sehr dicke Schicht aus Biotin-Avidin-Biotin von der Oberfläche abgeschirmt, was mit entsprechenden Nachteilen in der Detektion der Fluoreszenz einhergeht.

10

### Liganden (Targets)

15 Als Liganden werden Moleküle bezeichnet, die spezifisch mit dem an einer Oberfläche immobilisierten Nukleinsäure-Oligomeren (Sonde) unter Ausbildung eines Komplexes wechselwirken. Als Komplexbindungspartner von Nukleinsäure-Oligomeren fungieren die komplementären Nukleinsäure-Oligomere.

20

### Fluorophore

Als Fluorophore werden kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Texas Red®, Rhodamin-Farbstoffe, Cyäninfarbstoffe wie z. B. Cy3™, Cy5™, Fluorescein etc  
25 (vgl. Fluka, Amersham und Molecular Probes Katalog) verwendet.

### Fluoreszenzlöschung

30 Mit Fluoreszenzlöschung wird die Deaktivierung einer elektronisch angeregten Spezies über einen strahlungslosen Prozess bezeichnet. Die Deaktivierung kann durch Stöße oder auch durch strahlungslose Energieübertragung auf Metalle erfolgen. Die freiwerdende Energie wird als thermische Energie dissipiert. Gold ist ein Beispiel für ein Metall, das die Fähigkeit zur Fluoreszenzlöschung besitzt. Die Löschung weist eine

starke Abhängigkeit vom Abstand des Fluorophors von der als Fluoreszenzlöcher fungierenden Oberfläche auf (umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands). Der Effekt der Fluoreszenzlöschung ist daher nur bei Abständen kleiner 100 bis 200 Å messbar. Im Bereich größer als ca. 200 Å führen weitere Abstandsänderungen nicht mehr zu einer messbaren Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

10

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quench-Oberflächen;

Fig. 2 A: Messung der Fluoreszenz-Intensitätsänderung einer 20mer und einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde (einsträngig) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche;

B: Messung der Fluoreszenz-Intensitätsänderung vor und nach der sequenzspezifischen Hybridisierung einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde mit dem komplementären Gegenstrang (Target) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche.

15

### Bezugszeichenliste

- 20 102: Fluorophor
- 201: einsträngige Oligomer-Sonde
- 202: Sonde hybridisiert mit Target
- 203: Oberfläche (z. B. Gold)

**204:** Abstand des Fluorophor zur Goldoberfläche vor der Hybridisierung

**205:** Abstand des Fluorophor zur Goldoberfläche nach der Hybridisierung

- 5    Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quench-Oberflächen. In Figur 1A ist der Fall dargestellt, dass das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 vor der Hybridisierung in einer Form vorliegt, die durch einen großen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quenchender Metalloberfläche
- 10    charakterisiert ist. Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) verringert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität (Balkendiagramm der Figur 1A). Figur 1B zeigt den Fall, dass das
- 15    einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 vor der Hybridisierung in einer Form vorliegt, die durch einen geringen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quenchender Metalloberfläche 203 charakterisiert ist. Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) vergrößert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher
- 20    fungierenden Metalloberfläche 203. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Balkendiagramm der Figur 1B).

- Figur 2A zeigt eine Auftragung der Fluoreszenz-Intensitäten einer 20mer und einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde (einsträngig) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier
- 25    Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität von 200  $\mu\text{m}$ -Spots von auf einer 1  $\text{cm}^2$  großen Gold-Platte immobilisierten Einzelstrang-Sondenoligonukleotiden (20 mer und 30 mer) mit Cy3<sup>TM</sup> als kovalent angebundenem Fluorophor. Die Auftragung gemäß Figur 2 B zeigt die Fluoreszenz-Intensität vor und nach der sequenzspezifischen Hybridisierung einer
- 30    30mer-Nukleinsäure-Sonde mit dem komplementären Gegenstrang (Target) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche unter ansonsten gleichen Bedingungen wie in Zusammenhang mit Figur 2A beschrieben. Aus der Figur 2B geht deutlich hervor, dass sich bei Salzkonzentrationen von mehr als 0,5 mol/l die Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung um bis zu

einem Faktor 5 erhöht. Dies erlaubt auch bei parallelen Verfahren eine eindeutige Detektion der erfolgten Hybridisierungen.

5

### Wege zur Ausführung der Erfindung

Um die Vorteile der DNA-Chip-Technologie auf die Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden durch Modulation des Fluoreszenzquenchens anzuwenden, werden  
10 verschiedene modifizierte Nukleinsäure-Oligomer-Sonden unterschiedlicher Sequenz mit den oben beschriebenen Immobilisierungstechniken an einen Träger gebunden. Mit der Anordnung der Nukleinsäure-Oligomer-Sonden bekannter Sequenz an jeder  
Position der Oberfläche, einem DNA-Array, soll das Hybridisierungsereignis eines beliebigen Target-Nukleinsäure-Oligomers oder einer (fragmentierten) Target-DNA  
15 detektiert werden, um z. B. Mutationen im Target aufzuspüren und sequenzspezifisch nachzuweisen. Dazu werden auf einer Oberfläche die Oberflächenatome oder -moleküle eines definierten Bereichs (einer Test-Site) mit DNA-/RNA-/PNA-Nukleinsäure-Oligomeren bekannter, aber beliebiger Sequenz, wie oben beschrieben, verknüpft. In einer allgemeinsten Ausführungsform kann der DNA-Chip auch mit einem  
20 einzigen Sonden-Oligonukleotid derivatisiert werden. Als Sonden-Nukleinsäure-Oligomere werden Nukleinsäure-Oligomere (z. B. DNA-, RNA- oder PNA-Fragmente) der Basenlänge 3 bis 50, bevorzugt der Länge 5 bis 40, besonders bevorzugt der Länge  
12 bis 30 verwendet.

25 An den so bereitgestellten Oberflächen mit immobilisierten und Fluorophor-markierten Sonden-Oligonukleotiden wird in einer Referenzmessung, z. B. mit einem Fluoreszenz-Scanner, die Fluoreszenzintensität der Fluorophor-markierten Sonden-Oligonukleotide im einsträngigen Zustand bestimmt.

30 Im nächsten Schritt wird die (möglichst konzentrierte) Untersuchungslösung mit Target-Oligonukleotid(en) zur Oberfläche mit immobilisierten Sonden-Oligonukleotiden gegeben. Dabei kommt es nur in dem Fall zur Hybridisierung, in dem die Lösung Target-Nukleinsäure-Oligomer-Stränge enthält, die zu den an die Oberfläche



gebundenen Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren komplementär, oder zumindest in weiten Bereichen komplementär sind.

5 Nach der Hybridisierung zwischen Sonde und Target wird in einer zweiten Fluoreszenzmessung die Fluoreszenzintensität im hybridisierten, doppelsträngigen Zustand bestimmt.

10 Die Differenz aus Referenzmessung und zweiter Messung je Test-Site ist proportional zur Anzahl der ursprünglich in der Untersuchungslösung für das jeweilige Test-Site vorhandenen komplementären (bzw. in weiten Bereichen komplementären) Target-Oligonukleotide.

15 Gemäß einem alternativen Verfahren kann die Referenzmessung weggelassen werden, wenn die Größe des Referenzsignals vorher (z. B. durch vorausgegangene Messungen etc.) hinlänglich genau bekannt ist.

20 Aufgrund der Hybridisierung von Sonden-Nukleinsäure-Oligomer und dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang (Target) verändert sich der Abstand zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche. Aufgrund des veränderten Abstandes erfährt auch das Ausmaß des Quench-Vorgangs und damit die Intensität der Fluoreszenz eine starke Änderung. Somit kann ein sequenzspezifisches Hybridisierungsereignis durch fluoreszenzbasierte Verfahren wie z. B. Fluoreszenzmikroskopie oder Messungen mit Fluoreszenz-Scanner detektiert werden.

25

Durch eine gezielte Beeinflussung des Salzgehalts der Lösung lassen sich für das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer verschiedene räumliche Anordnungen realisieren:

30 a) Vor der Hybridisierung liegt das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 in einer Form vor, die durch einen großen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quencher Metalloberfläche 203 charakterisiert ist (hohe Fluoreszenzintensität). Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) verändert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden

Farbstoffmolekül 102 und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203 dahingehend, dass es durch die Verringerung des Abstands zu einer Vermehrung des Quenchen kommt und eine geringere Intensität der Fluoreszenz nach der Hybridisierung beobachtet werden kann (siehe Figur 1A).

5

b) Vor der Hybridisierung liegt das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 in einer Form vor, die durch einen geringen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quencher Metalloberfläche 203 charakterisiert ist (geringe Fluoreszenzintensität). Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) verändert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül 102 und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203 dahingehend, dass es durch die Vergrößerung des Abstands zu einer Verringerung des Quenchen kommt und eine höhere Intensität der Fluoreszenz nach der Hybridisierung beobachtet werden kann (siehe Figur 1B).

10

15

Die beiden oben dargestellten geometrischen Anordnungen können durch die Variation der Ionenstärke, insbesondere der Salzkonzentration erreicht werden. Dabei können beliebige Salze verwendet werden mit Ausnahme von bivalenten Salzen (z. B.  $Mg^{2+}$ ) oder chaotropen Salzen. Bei niedrigem bis mittlerem Salzgehalt liegt die oberflächengebundene einsträngige Sonde in einer eher gestreckten Konformation vor (siehe Figur 1A). Durch die Hybridisierung wird eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (siehe Figur 1A, 2B). Bei hohem Salzgehalt liegt die oberflächengebundene einsträngige Sonde in einer eher komprimierten Konformation vor (siehe Figur 1B). Durch die Hybridisierung wird eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (siehe Figur 1B, 2B).

20

25

### Ausführungsformen

30

Die n Nukleotide (nt) lange Nukleinsäure-Sonde (DNA, RNA oder PNA, z. B. ein 20 Nukleotide langes Oligo) ist in der Nähe eines ihrer Enden (3'- oder 5'-Ende) direkt oder über einen (beliebigen) Spacer mit einer reaktiven Gruppe zur kovalenten Verankerung an der Oberfläche versehen, z. B. als 3'-Thiol-modifiziertes Sonden-Oligonukleotid, bei

dem die endständige Thiolmodifikation als reaktive Gruppe zur Anbindung an Gold dient. Weitere kovalente Verankerungsmöglichkeiten ergeben sich z. B. aus aminmodifiziertem Ligat-Oligonukleotid, das zur Verankerung an oberflächlich gebundene Carbonsäurefunktionen (z. B. über säurefunktionalisierte Thiole wie Mercaptopropionsäure und eine Aktivierung z. B. als Aktivester) verwendet wird. In der Nähe des anderen Terminus des Sondenoligonukleotids ist ein Fluorophor kovalent angebunden (vgl. Beispiel 1). Die so modifizierte Nukleinsäure-Sonde wird

(i) in Puffer (z. B. 10 - 500 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA) gelöst mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des Sonden-Nukleinsäureoligomers an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden oder

(ii) in Gegenwart eines monofunktionalen Linkers in Puffer (z. B. 100 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA, 0,1 - 1 M NaCl) gelöst mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des Sonden-Nukleinsäureoligomers gemeinsam mit dem monofunktionalen Linker an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden, wobei darauf geachtet wird, dass genügend monofunktionaler Linker geeigneter Kettenlänge zugesetzt wird (etwa 0.1 bis 10 facher Überschuss), um zwischen den einzelnen Sonden-Oligonukleotiden genügend Freiraum für eine Hybridisierung mit den Signal-Liganden bzw. dem Target-Oligonukleotid zur Verfügung zu stellen oder

(iii) in Puffer (z. B. 10 - 350 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA) gelöst mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des Sonden-Nukleinsäureoligomers an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden und anschließend wird die so modifizierte Oberfläche mit dem entsprechenden monofunktionalen Linker in Lösung (z. B. Alkanthiole oder  $\omega$ -Hydroxy-Alkanthiole in Phosphat-Puffer/EtOH-Mischungen bei Thiol-modifizierten Sondenoligonukleotiden) in Kontakt gebracht, wobei der monofunktionale Linker über seine reaktive Gruppe an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche

anbindet (vgl. Abschnitt "Bindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche").

- Die (Rest-) Fluoreszenz des Fluorophors am Sonden-Oligonukleotid wird durch ein  
5 geeignetes Verfahren detektiert, z. B. durch Fluoreszenzmessung mit einem  
Fluoreszenz-Scanner in Gegenwart verschiedener Salzkonzentrationen (vgl. Beispiel  
7). Die Fluoreszenzintensität des einsträngigen Sonden-Oligonukleotids zeigt ein  
Maximum bei einer Salzkonzentration zwischen 0,05 und 0,25 mol/l (siehe Figur 2A).  
Anschließend wird das gelöste Target zugegeben, potentielle Hybridisierungsereignisse  
10 werden unter geeigneten, dem Fachmann bekannten Bedingungen ermöglicht  
(beliebige, frei wählbare Stringenzbedingungen, der Parameter  
Potential/Temperatur/Salz/chaotrope Salze etc. für die Hybridisierung) und die Messung  
zur Detektion des Fluorophors wiederholt.
- 15 Der Unterschied im Messsignal (Ab- bzw. Zunahme, je nach Salzkonzentration, vgl. Fig.  
1) ist proportional zur Anzahl der Hybridisierungsereignisse zwischen Sonden-  
Nukleinsäureoligomer auf der Oberfläche und passendem Target-Nukleinsäure-  
Oligomer in der Untersuchungslösung (vgl. Bsp. 8).
- 20 Das beschriebene Verfahren kann für eine Targetart (z. B. eine bestimmte  
Targetoligonukleotid-Art mit bekannter Sequenz) an einer Oberfläche oder - bei  
Verwendung verschiedener Sonden-Arten je Test-Site - für mehrere Target-Arten  
(mehrere verschiedene Target-Oligonukleotid-Arten) angewendet werden.

25

### **Beispiel 1**

*Darstellung der aminomodifizierten Oligonukleotide zur Verankerung auf modifizierten  
Goldoberflächen als Ligat- bzw. Sondenoligonukleotide*

30

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-  
Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller  
empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den Synthesen mit  
dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden

die Oxidationsschritte mit einer 0.02 M Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Der Amino-Modifizier C2 dT (Glen Research 10-1037) wird in die Sequenzen mit den jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

Die Oligonukleotide werden mit konzentriertem Ammoniak (30%) bei 37 °C 16 h entschützt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt mittels RP-HPL Chromatographie nach Standardprotokollen (Laufmittel: 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer, Acetonitril), die Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS. Die aminmodifizierten Oligonukleotide werden an die entsprechend aktivierten Fluorophore (z. B. Fluoresceinisothiocyanat) gemäß dem Fachmann bekannten Bedingungen gekoppelt. Die Kopplung kann sowohl vor als auch nach der Anbindung der Oligonukleotide an die Oberfläche erfolgen.

### Beispiel 2

*Darstellung der fluorophormodifizierten Oligonukleotide zur Verankerung auf modifizierten Goldoberflächen als Ligat- bzw. Sondenoligonukleotide*

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden die Oxidationsschritte mit einer 0.02 M Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Die Fluorophore werden am Synthesizer beim letzten Kopplungsschritt als Phosphoramidite (Glen Research 10-1037) in die Sequenzen mit dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

### Beispiel 3

#### Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-FP}$

- 5 Die Quench-Oberfläche (hier: Gold-Plättchen) wird mit doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation 1: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit  $(\text{HO-(CH}_2)_2\text{-S)}_2$  zum  $\text{P-O-(CH}_2)_2\text{-S-S-(CH}_2)_2\text{-OH}$  verestert; Modifikation 2: an das 5' Ende ist der Fluorescein-Modifizierer Fluorescein-Phosphoramidite (Proligo/ Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen
- 10 Standardprotokoll eingebaut) in  $5 \times 10^{-5}$  molarer Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) mit Zusatz von ca.  $10^{-5}$  bis  $10^{-1}$  molarem Propanthiol (oder anderen Thiolen oder Disulfiden geeigneter Kettenlänge) 2 - 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer  $\text{P-O-(CH}_2)_2\text{-S-S-(CH}_2)_2\text{-OH}$  des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine
- 15 kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie Propanthiol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt). Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem
- 20 Komplementärstrang hybridisiert sein.

### Beispiel 4

#### 25 Alternative Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-FP}$

- Die alternative Herstellung von  $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-FP}$  gliedert sich in 2 Teilabschnitte, nämlich der Derivatisierung der Gold-Oberfläche mit dem Sonden-Oligonukleotid (Inkubationsschritt) und der Nachbelegung der so modifizierten Elektrode mit einem
- 30 geeigneten monofunktionalen Linker (Nachbelegungsschritt).

Die Quench-Oberfläche (hier: Gold-Plättchen) wird mit doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation 1: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit  $(\text{HO-(CH}_2)_2\text{-S)}_2$  zum  $\text{P-O-(CH}_2)_2\text{-S-$

S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH verestert; Modifikation 2: an das 5' Ende ist der Fluorescein-Modifizierer Fluorescein-Phosphoramidite (Proligo Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) in 5x10<sup>-5</sup> molarer Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) 2 - 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

Anschließend wird die so modifizierte Gold-Oberfläche mit einer ca. 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-1</sup> molaren Propanthiol-Lösung (in Wasser oder Puffer, pH 7 - 7.5) komplett benetzt und 2 - 24 h inkubiert. Das freie Propanthiol belegt die nach dem Inkubationsschritt verbleibende freie Gold-Oberfläche durch Ausbildung einer Au-S Bindung. Alternativ zu Propanthiol kann auch ein anderes Thiol oder Disulfid geeigneter Kettenlänge verwendet werden.

## 20 **Beispiel 5**

### *Alternative Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-ss-oligo-FP*

Die alternative Herstellung von Au-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-ss-oligo-FP gliedert sich in 2 Teilabschnitte, nämlich der Derivatisierung der Gold-Oberfläche mit dem Sonden-Oligonukleotid (Inkubationsschritt) und der Nachbelegung der so modifizierten Elektrode mit einem geeigneten bifunktionalen Linker (Nachbelegungsschritt).

Die Quench-Oberfläche (hier: Gold-Plättchen) wird mit doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation 1: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit (HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S)<sub>2</sub> zum P-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH verestert; Modifikation 2: an das 5' Ende ist Fluorescein-Modifizierer Fluorescein-Phosphoramidite (Proligo Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) in 5x10<sup>-5</sup> molarer Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) 2

- 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer  $\text{P-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-S-S-(CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$  des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxymercaptoethanols kommt. Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

Anschließend wird die so modifizierte Gold-Oberfläche mit einer ca.  $10^{-5}$  bis  $10^{-1}$  molaren Lösung von kurzkettigen Alkanthiolen (in Wasser oder Puffer, pH 7 - 7.5 oder in Ethanol) komplett benetzt und 2 - 24h inkubiert. Das freie Thiol belegt die nach dem Inkubationsschritt verbleibende freie Gold-Oberfläche durch Ausbildung einer Au-S Bindung. Alternativ können auch andere funktionale Thiole oder Disulfide geeigneter Kettenlänge mit den gleichen oder anderen funktionellen Gruppen verwendet werden.

### Beispiel 6

*Fluoreszenz-Intensitätsmessungen am System Au-ss-oligo-Fluorescein bzw. am System Au-ds-oligo-Fluorescein in Gegenwart von flüssigen Medien*

Die Sonden-Oberfläche wird analog zu Bsp. 4 hergestellt. Dazu wird ein modifiziertes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Fluorescein-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' [ $\text{C}_3\text{-S-S-C}_3\text{-OH}$ ] auf Gold immobilisiert (50  $\mu\text{mol}$  Oligonukleotid in Phosphat-Puffer ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  500 mM, pH 7, Nachbelegung mit Propanthiol 1mM in Wasser) und in der Form *Au-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-ss-oligo-Fluorescein* die Fluoreszenzintensität der Oberfläche mit einem Fluoreszenz-Scanner der Firma Lavision Biotech in Gegenwart von verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt. Zur Messung der Fluoreszenz in Gegenwart von flüssigen Medien werden 150  $\mu\text{l}$  des Mediums auf die Goldoberfläche gegeben und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt. Alternativ können auch Hybriwells oder Imaging Chambers verwendet werden.



**Beispiel 7***Modulation des Abstands über die Ionenstärke/Salzkonzentration*

- 5 Die Sonden-Oberfläche wird analog zu Beispiel 4 hergestellt und analog Beispiel 6 vermessen. Durch Variation der Salzkonzentration (NaCl-Konzentration) im einem Bereich zwischen  $1 \times 10^{-4}$  und 3 Mol/Liter wird die geometrische Anordnung der einsträngigen Sonde moduliert. Die durch die Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration erhaltenen Werte sind in der Figur 2A dargestellt. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,5 Mol/Liter, besonders aber im Bereich zwischen 0,05 und 0,25 Mol/Liter ist die Fluoreszenzintensität am höchsten, d. h. der Fluorophor hat den größten Abstand zur Goldoberfläche.

15 **Beispiel 8**

*Fluoreszenzmessung am System Au-ss-oligo/Farbstoff-modifizierte Nukleinsäure-Oligomere in Abwesenheit und in Gegenwart von Target-Oligonukleotid (komplementär zu ss-oligo in Au-ss-oligo)*

- 20 Gemäß Bsp. 4 wird eine Sonden-Elektrode hergestellt. Dazu wird ein modifiziertes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Fluorescein-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' [ $C_3$ -S-S- $C_3$ -OH] auf Gold immobilisiert (50  $\mu$ mol Oligonukleotid in Phosphat-Puffer ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  500 mM, pH 7). Anschließend werden analog zu Beispiel 7 in Gegenwart von NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen Fluoreszenzmessungen mit einem Fluoreszenz-Scanner durchgeführt. Nach Hybridisierung mit komplementären Oligomeren in Phosphat-Puffer (500mM, 1mM EDTA, 1M NaCl) werden gemäß Beispiel 7 in Gegenwart von NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen Fluoreszenzmessungen mit einem Fluoreszenz-Scanner durchgeführt. Die durch die Messung der Fluoreszenzintensität für den hybridisierten und den nichthybridisierten Fall in Abhängigkeit von der Salzkonzentration erhaltenen Werte sind in der Figur 2B dargestellt.

Im Bereich oberhalb einer Salzkonzentration von 0,5 Mol/Liter ist die Fluoreszenz nach der Hybridisierung um Größenordnungen höher als vor der Hybridisierung. Dieses Ergebnis überrascht, da die Fluoreszenz des Einzelstrangs in einem Bereich zwischen 0,05 und 0,25 mol/l Salzkonzentration ein Maximum aufweist. Die deutlichste Differenz 5 der Fluoreszenzintensität vor bzw. nach Hybridisierung zeigt sich jedoch in einem Bereich der Salzkonzentration, in dem die Fluoreszenz des Einzelstrangs deutlich abnimmt (Figur 2B).

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen umfassend die Schritte

- a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere (201) durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor (102) modifiziert sind,
- b) Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren,
- c) Einstellen einer definierten Salzkonzentration in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung,
- d) Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche,
- e) Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102),
- f) Vergleich der in Schritt e) detektierten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten,

dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine Salzkonzentration größer 0,5 mol/l eingestellt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nach Schritt c) und vor Schritt d) der Schritt

- c<sub>1</sub>) erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102)

durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit den in Schritt c<sub>1</sub>) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Schritt e) der Schritt

- e) Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102) und Detektion von Referenzwerten

durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit den ebenfalls in Schritt e) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

- 5 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Detektion der Referenzwerte in Schritt e) durch Detektion der Fluoreszenz eines Bereiches der modifizierten Oberfläche erfolgt, in dem im wesentlichen keine Liganden angebunden sind.
- 10 5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Detektion der Referenzwerte in Schritt e) durch Detektion der Fluoreszenz eines Bereiches der modifizierten Oberfläche erfolgt, in dem im wesentlichen ausschließlich Ligand/Ligat-Komplexe gebunden anwesend sind.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Detektion der Referenzwerte in Schritt e) durch Detektion der Fluoreszenz eines Bereiches der modifizierten Oberfläche erfolgt, in dem im wesentlichen keine Liganden gebunden sind, und zusätzlich durch Detektion eines zweiten Bereiches der modifizierten Oberfläche erfolgt, in dem im wesentlichen ausschließlich Ligand/Ligat-Komplexe gebunden anwesend sind.
- 20 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in Schritt c) eine Salzkonzentration zwischen 0,5 und 10 mol/l, insbesondere zwischen 1 und 10 mol/l eingestellt wird.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei in Schritt c) eine Salzkonzentration zwischen 0,5 und 3 mol/l, insbesondere zwischen 2 und 3 mol/l eingestellt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Fluorophor (102) ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird.
- 30 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Fluorophor (102) Texas Red, ein Rhodamin-Farbstoff, insbesondere Rhodamin G6 (Basic Red 1), Fluorescein (Resorcinphthalein), oder ein Cyaninfarbstoff, insbesondere 5,5'-disulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin (Cy3™) oder

5,5',7,7'-tetrasulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3,3',3'-tetramethylbenzindodicarbocyanin (Cy5™) verwendet wird.

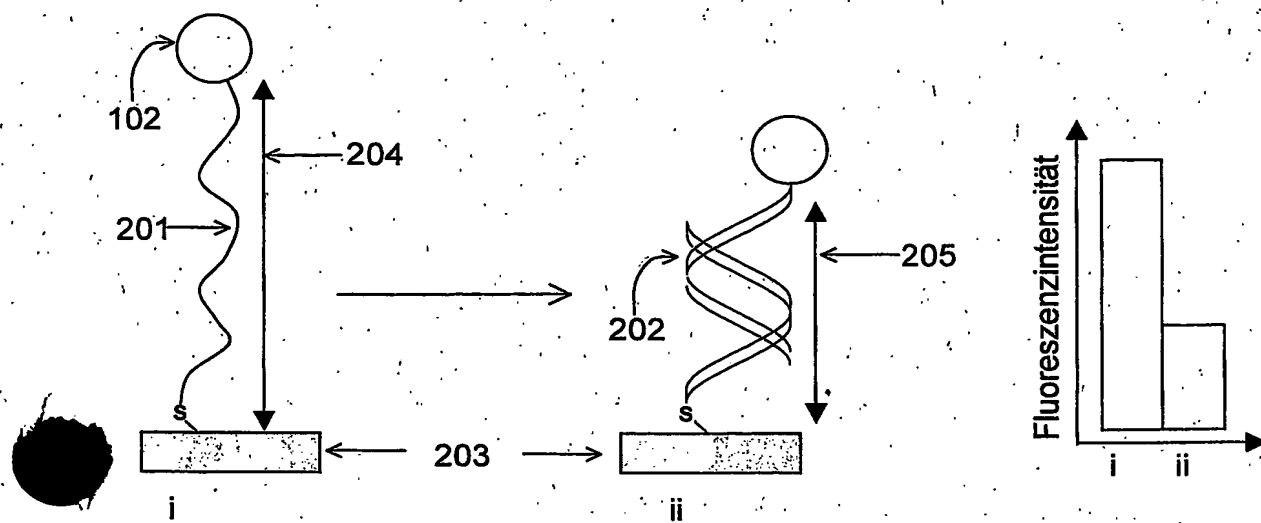
- 5 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei der modifizierten Oberfläche um eine eine Modifikation tragende Oberfläche aus einem Metall oder einer Metallegierung handelt, insbesondere aus einem Metall ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gold, Silber, Kupfer und deren Mischungen.
- 10 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere 3 bis 50 Basen, insbesondere 5 bis 40 Basen, besonders bevorzugt 12 bis 30 Basen umfassen.
- 15 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Modifikation der Oberfläche in der Anbindung von ausschließlich Nukleinsäure-Oligomeren besteht.
- 20 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Oberfläche zusätzlich durch Anbindung eines kurzkettigen Co-Adsorbats modifiziert ist, insbesondere eines Co-Adsorbats der Kettenlänge 1 bis 10, besonders bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 5.
- 25 15. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 14 umfassend eine modifizierte Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind.

### Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen, das als ersten Schritt das  
5 Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche umfasst. Die Modifikation der Oberfläche besteht dabei in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren 201, wobei die Nukleinsäure-Oligomere 201 durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor 102 modifiziert sind. Die weiteren Schritte des  
10 erfindungsgemäßen Verfahrens sind Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren, Einstellen einer definierten Salzkonzentration von größer 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche, Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors und Vergleich der detektierten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten.

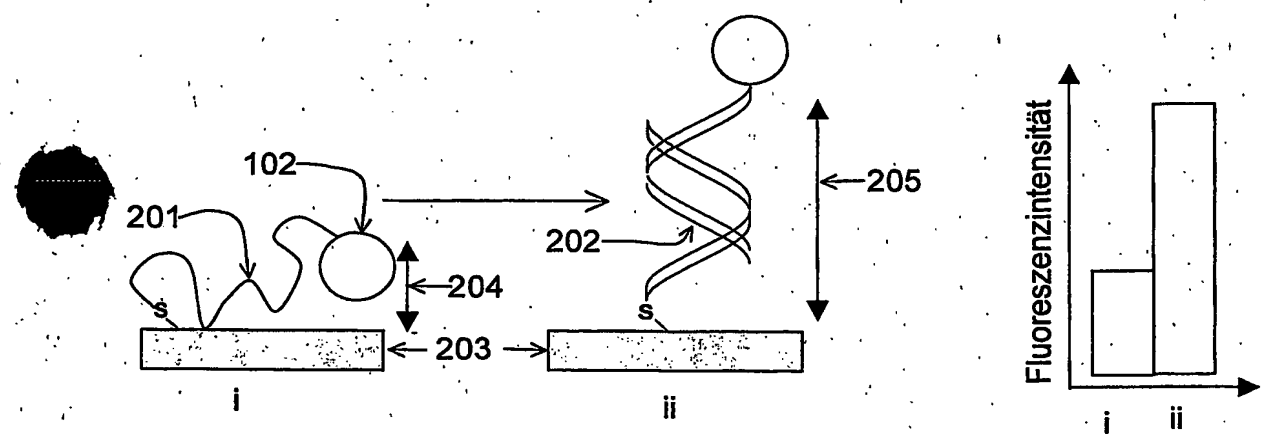
15

(Fig. 2)



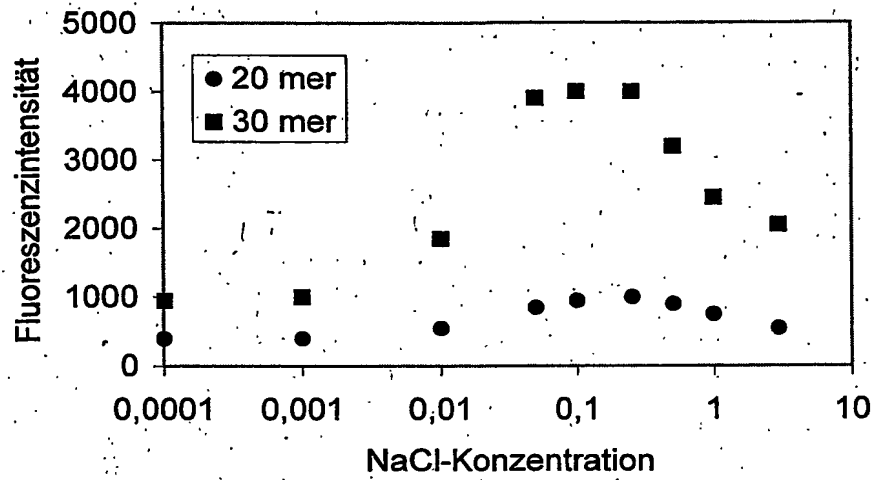
Figur 1A

5



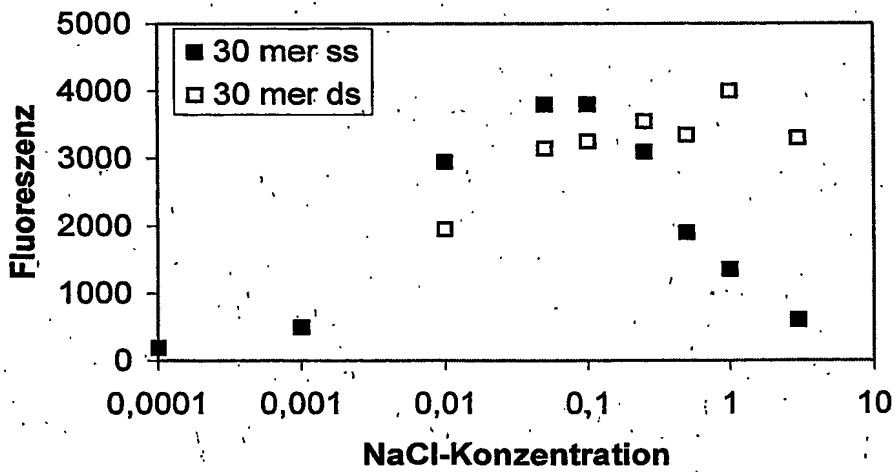
Figur 1B

10



Figur 2A

5



Figur 2B

10



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**